

# LCMS-8045 测定牛奶中黄曲霉毒素 M 族含量

LCMSMS-523

**摘要：** 本文使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪建立了一种 LC-MS/MS 测定牛奶中黄曲霉毒素 M 族残留量的方法。样品前处理方法参照《GB 5009.24-2016 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中的方法进行，牛奶样品经过甲醇提取后，采用免疫亲和柱进行净化，净化液浓缩后进行液质联用分析。两种黄曲霉毒素在 0.05-5 ng/mL 范围内线性良好，线性相关系数 > 0.999，检出限在 0.005 μg/kg，选 0.25、1、2.5 ng/mL 三个浓度水平标准工作液，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.184~0.369% 和 1.001~3.622% 之间，系统精密度良好。同时还考察了空白牛奶基质加标，回收率在 98.2-112.1% 之间。

**关键词：** 三重四极杆串联质谱 黄曲霉毒素 牛奶

黄曲霉毒素是存在于自然界的一种霉菌毒素，具有致癌作用。目前已经报道的黄曲霉毒素有 12 种，包括：B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、P<sub>1</sub>、Q、H<sub>1</sub>、GM、B<sub>2a</sub> 和毒醇。其中黄曲霉毒素 M 族分为 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> (AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub>)，主要存在于食用了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 污染的饲料的动物的乳、肾脏、肝脏中，其中乳中最常见，具有极强的致癌性。牛奶经过巴氏杀菌后，黄曲霉毒素仍然存在，严重危害人体健康。因此，建立一种快速简单、准确、灵敏的检测乳中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 的方法意义重大。

目前关于奶及奶制品中黄曲霉毒素 M 族的检测大多只关注 M<sub>1</sub>，同时检测两种毒素的报道不太多。检测方法主要有薄层色谱法 (TLC)、酶联免疫法 (ELISA)、高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS)。我国《GB 5009.24-2016 食品中黄曲霉

素 M 族的测定》中规定了黄曲霉毒素 M 族的测定方法，该标准中规定了 3 种检测方法，分别是同位素稀释 - 液相色谱串联质谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附筛查法。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8045 联用系统，参照《GB 5009.24-2016 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中规定的检测方法，建立了一种可以快速准确测定牛奶中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 的方法。

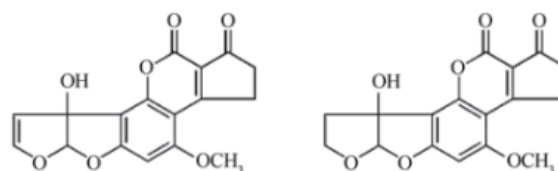


图 1 黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> (左)、M<sub>2</sub> (右) 结构式

## 实验部分

### 1.1 仪器

输液泵：LC-30AD×2

脱气机：DGU-20A<sub>5R</sub>

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

系统控制器：CBM-20A

检测器：LCMS-8045 三重四极杆质谱仪

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.96

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, P/N:227-30048-02,

岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -0.2% 甲酸 5 mmol/L 甲酸铵水溶液 B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：10  $\mu$ L

柱温：40  $^{\circ}$ C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 3%，时间程序见表 1。

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	32
4.20	Pumps	Pump B Conc.	45
5.00	Pumps	Pump B Conc.	100
5.70	Pumps	Pump B Conc.	100
6.00	Pumps	Pump B Conc.	32
8.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI (+)

脱溶剂管温度：250  $^{\circ}$ C

离子源接口电压：-1.5 kV

加热模块温度：400  $^{\circ}$ C

雾化气：氮气 3.0 L/min

接口温度：300  $^{\circ}$ C

干燥气：氮气 5 L/min

扫描模式：MRM

加热气：空气 15 L/min

MRM 参数：见表 2

碰撞气：氩气

表 2 MRM 优化参数

中文名	监测离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
AFT M <sub>1</sub>	329.10>273.10*	-24	-23	-20
	329.10>259.10	-24	-25	-28
<sup>13</sup> C <sub>17</sub> - AFT M <sub>1</sub>	346.20>317.20	-24	-22	-24
	346.20>288.20*	-24	-25	-32
AFT M <sub>2</sub>	331.15>273.05*	-22	-23	-20
	331.15>259.10	-22	-23	-28

\* 表示定量离子

### 1.3 标准品与试剂

标准品：购于上海安谱，于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。

试剂：黄曲霉毒素 M 族免疫亲和柱，购于上海安谱，4  $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。

### 1.4 标准系列工作液：

用乙腈配制 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 浓度均为 100 ng/mL 的混合标准工作溶液，<sup>13</sup>C<sub>17</sub>- AFT M<sub>1</sub> 浓度为 50 ng/mL 的内标工作液，准确移取 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 混合标准工作液和内标工作液适量，用初始流动相稀释成 AFT M<sub>1</sub> 和 AFT M<sub>2</sub> 浓度均为 0.05 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.5 ng/mL、5.0 ng/mL 的系列标准溶液，其中 <sup>13</sup>C<sub>17</sub>- AFT M<sub>1</sub> 同位素内标浓度为 0.5 ng/mL。

### 1.5 样品前处理

按照《GB 5009.24-2016 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中规定的提取和净化步骤进行。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

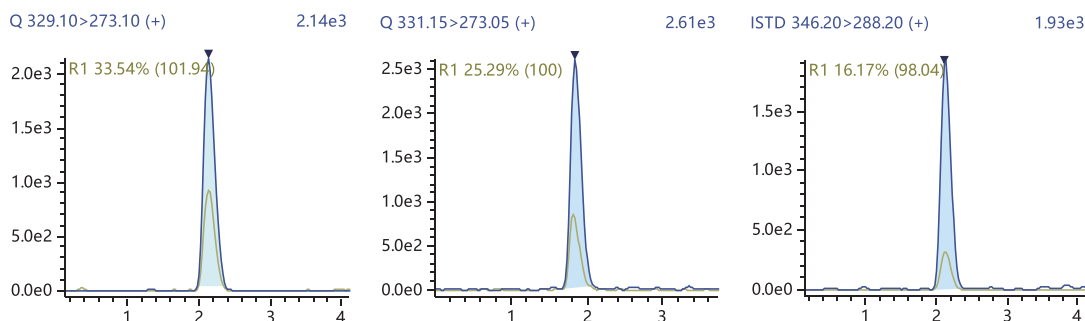


图2 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 标准品和内标（左、中、右，浓度均为 0.5 ng/mL）的 MRM 色谱图

### 2.2 线性范围和灵敏度

按照 1.2 中的分析条件对上述标准系列工作液进行测定，采用内标法定量。以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线，结果如图 3 所示。AFT M<sub>1</sub> 和 AFT M<sub>2</sub> 在 0.05-5 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数  $r > 0.999$ 。为了考察仪器灵敏度，选择 0.05 ng/mL 浓度混合标准溶液，按照上述分析条件上机进行测定，以 ASTM 作为噪音计算方法，根据  $S/N=3$  为检出限计算的原则，计算两种毒素的检出限和定量限，结果如表 3 所示，满足标准中规定的检测要求。

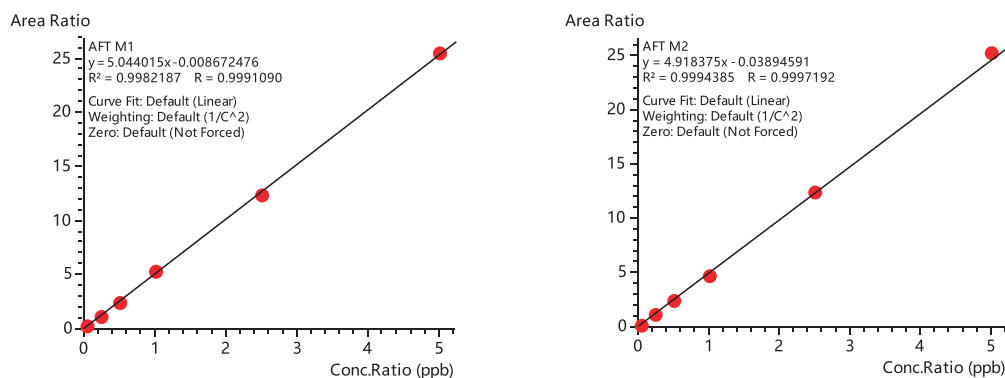


图3 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 校准曲线

表3 校准曲线参数

化合物名称	标准曲线	相关系数 r	线性范围 (ng/mL)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
AFT M <sub>1</sub>	$Y = 5.04402X - 0.00867$	0.9991	0.05-5	0.005	0.015
AFT M <sub>2</sub>	$Y = 4.91837X - 0.03895$	0.9997	0.05-5	0.005	0.015

### 2.3 精密度实验

不同浓度的混合标准工作液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.184~0.369% 和 1.001~3.622% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	RSD% (0.25 ng/mL)		RSD% (1 ng/mL)		RSD% (2.5 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
AFT M <sub>1</sub>	0.369	2.899	0.207	2.681	0.184	2.363
AFT M <sub>2</sub>	0.342	3.622	0.301	2.133	0.239	1.001

## 2.4 回收率实验

以空白牛奶样品进行加标回收实验, 准确称取 4 g 样品, 分别添加三个浓度水平的标准品及相应内标, 按照《GB 5009.24-2016 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中规定的前处理方法处理样品, 计算平均回收率。空白样品色谱图见图 4, 空白基质中未检测到黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>。加标回收色谱图见图 5, 各添加水平的平均回收率在 98.2-112.1% 之间, 详见表 5。

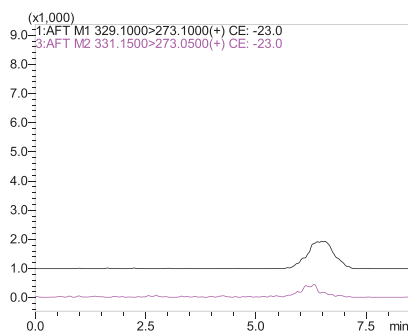


图 4 空白牛奶基质色谱图

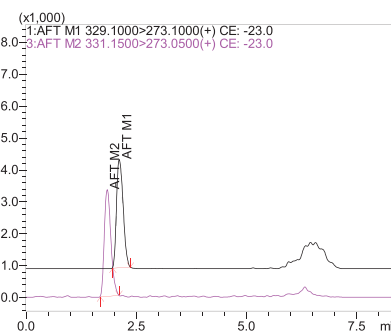


图 5 基质加标回收色谱图 (0.25 µg/kg)

表 5 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 回收率 (n=3)

名称	加标水平 (µg/kg)	回收率 %
AFT M <sub>1</sub>	0.05	102.3
	0.25	107.4
	1	112.1
AFT M <sub>2</sub>	0.05	100.7
	0.25	108.5
	1	98.2

## ■ 结论

本文使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪建立了一种 LC-MS/MS 测定牛奶中黄曲霉毒素 M 族残留量的方法。样品前处理方法参照《GB 5009.24-2016 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中的方法进行, 该方法快速简单、灵敏度高, 可供相关行业参考。

岛津应用云

